

Синтез конъюгатов лупановых тритерпеноидов с α -токоферолом и его аналогами – новых лекарственных агентов комплексного действия с иммуномодулирующей и антирадикальной активностью

Халитова Р.Р., * Спивак А.Ю., Шакурова Э.Р., Одинокоев В.Н.

Учреждение Российской академии наук Институт нефтехимии и катализа РАН, 450075 Уфа, просп. Октября, 141. Факс: (347)2842750; тел: (347)2842750; E-mail: ink@anrb.ru

Впервые синтезированы конъюгаты лупановых тритерпеноидов (бетулин, бетулоновая, бетулиновая кислоты) с α -токоферолом и его синтетическими аналогами. Соединение фрагментов биологически активных веществ осуществлено посредством образования сложноэфирной связи или через линкеры (остатки янтарной кислоты, гидразина, тетраметилендиамина, α -аминокислот и дипептидов), связывающие фенольный гидроксил или боковую цепь молекулы-антиоксиданта с атомами C^3 -или C^{28} -терпеноида. Исследования *in vitro* показали, что при низкой цитотоксичности некоторые из полученных соединений подавляют выработку оксида азота и не влияют на активность аргиназы, что позволяет предположить наличие у них противовоспалительных и иммуномодулирующих свойств.

Введение

Известно, что активные кислородсодержащие свободные радикалы – супероксид анион-радикал ($O^{\cdot-}$), гидропероксидный радикал (HO_2^{\cdot}), окись азота (NO^{\cdot}) в патофизиологических условиях окислительного стресса инициируют возникновение сердечно-сосудистых, онкологических, воспалительных и других заболеваний, обусловленных интенсификацией пероксидного окисления липидов клеточных мембран^[1-3]. В настоящее время при создании новых лекарственных средств, предназначенных для профилактики и лечения таких заболеваний, большие надежды возлагаются на гибридные соединения, в которых фармакофоры различных биологически активных веществ комбинированы с фрагментами молекул-антиоксидантов^[4-6]. Многочисленные работы свидетельствуют о перспективах использования в подобных комбинациях природного липофильного антиоксиданта α -токоферола и его синтетических аналогов. Так, модификация α -токоферолом известных противоопухолевых агентов ряда камптотецина и таксола позволила решить проблемы, связанные с ограниченной растворимостью этих препаратов в жирах и привела к повышению их терапевтической активности.

Сведения о конъюгатах токоферолов с тритерпеноидами ряда лупана (бетулин, бетулоновая и бетулиновая кислоты) в литературе отсутствуют, тогда как бетулин и его доступные производные составляют очень важный класс соединений для медицинской химии с широким спектром биологического действия. Особый интерес к лупановым терпеноидам вызван их противоопухолевыми, противовоспалительными и противовирусными (анти-ВИЧ) свойствами^[7-9]. В связи с этим в настоящей работе впервые осуществлен синтез и исследованы

фармакологические свойства конъюгатов токоферолов с тритерпеноидами лупанового ряда.

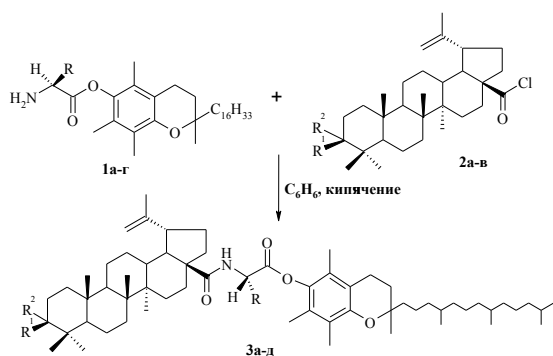
Результаты и обсуждение

Конденсация биологически активных веществ осуществлена посредством образования сложноэфирной связи или через линкеры (остатки биогенных α -аминокислот, дипептидов, гидразина, янтарной кислоты, тетраметилендиамина), связывающие фенольный гидроксил или боковую цепь молекулы-антиоксиданта с атомами C^3 -и C^{28} -терпеноида.

В синтезе биоконъюгатов α -токоферола с бетулоновой и бетулиновой кислотами, спейсированных остатками аминокислот, использовали ранее неизвестные аминокислотные производные токоферола **1a-g**, которые получали карбодиимидным методом, ацилируя α -токоферол карбобензилокси-производными глицина, L-валина, L-фенилаланина в присутствии N,N'-дициклогексилкарбодиимида (DCC) и n-(диметиламино)пиридина (DMAP). После деблокирования аминокислотной функции соединения **1a-g** сочетали с хлорангидридами лупановых кислот **2a-b**, полученных непосредственно перед реакцией действием оксалилхлорида на тритерпеновые кислоты. Конденсация токоферолов с лупановыми терпеноидами при кратковременном кипячении в бензоле привела к гибридным молекулам с выходами 61-82% (схема 1).

Синтез конъюгатов лупановых тритерпеноидов (бетулин, бетулоновая и бетулиновая кислоты) с синтетическими аналогами α -токоферола (гидрофильный антиоксидант кислота «Тролокс», водорастворимый метаболит α -токоферола - хроманилпропионовая кислота α -СЕНС) осуществляли посредством образования сложноэфирной связи или через линкеры в виде

Схема 1

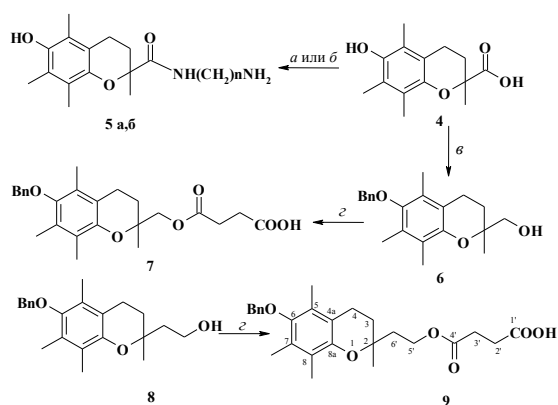


R = H (1a, 3a, r), Me₂CH (1b, 3b), PhCH₂ (1c, 3c), CbzHN(CH₂)₃ (1g, 3g),
R¹+R² = O (2a, 3a - в), R¹ = OH, R² = H (2b, 3b), R¹ = OAc, R² = H (2в, 3д)

остатков янтарной кислоты, гидразина и тетраметилендиамина.

Для получения целевых конъюгатов кислоту «Тролокс» **4** трансформировали в гидразид **5a** или амидное производное **5b** взаимодействием с моногидратом гидразина или используя избыток (4 мол. экв.) 1,4-диаминобутана в присутствии N,N'-карбонилдиимидзола (CDI) (схема 2).

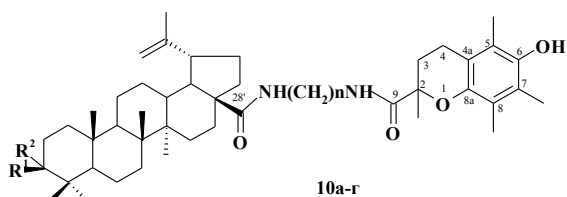
Схема 2



Реагенты и условия: а. CDI, NH₂NH₂, H₂O, ТГФ; б. CDI, NH₂(CH₂)₄NH₂, ТГФ в. 1). TsOH, MeOH, 2). BnCl-K₂CO₃, ДМФА, 3). LiAlH₄, Et₂O; г. C₄H₉O₃, DMAI

Гемисукцинатные эфиры спиртов **7**, **9** синтезировали взаимодействием хроманилметанола **6** и хроманилэтанола **8** с избытком янтарного ангидрида в присутствии каталитических количеств DMAP в безводном пиридине при комнатной температуре.

Схема 3

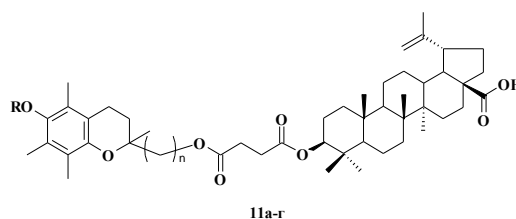


R¹+R²=O (10a, 10r), R¹=OH, R²=H (10b), R¹=OAc, R²=H (10в),
n = 0 (10a-в), 4 (10r).

Сочетанием соединений **5a, б** с хлорангидридами тритерпеновых кислот **2a-в** синтезированы конъюгаты **10a-г**.

Конъюгаты **11a, б** со спейсером в виде остатка янтарной кислоты, связывающего молекулу антиоксиданта с атомом C³ бетулиновой кислоты, получены взаимодействием гемисукцинатных эфиров **7**, **9** с бетулиновой кислотой в ТГФ в присутствии дициклогексилкарбодиимида (DCC) и DMAP. Дебензилирование соединений **11a** и **11b** гладко протекало гидрированием в присутствии катализатора Pd-C в диэтиловом эфире и приводило к аддуктам **11в** и **11г** с количественным выходом.

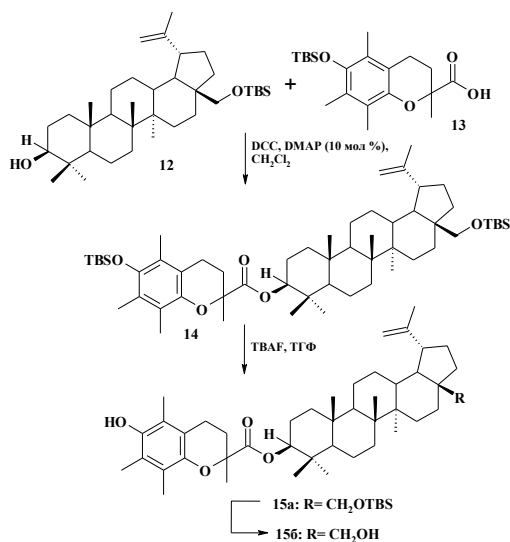
Схема 4



R=Bn (11a, б); R=H (11в, г); n=1 (11a, в), 2 (11b, г).

Ацилаты бетулина, бетулиновой и бетулоновой кислот с хроманил содержащими карбоновыми кислотами или спиртами были синтезированы с использованием современных реагентов для активации карбоксильных групп (DCC, DIC, EDC, CDI), селективной защиты и избирательного деблокирования функциональных групп в терпеноидах и в хроманолах.

Схема 5



При этом защитные группы выбирали таким образом, чтобы иметь возможность снять их в ацилатах в одну стадию. Так, например, в синтезе конъюгата **14** использовали 6-О-защищенную кислоту **13** и 28-О-эфирное производное бетулина **12** (схема 3).

Деблокирование ОН-группы в фенольном фрагменте ацилата **14** под действием фторида тетрабутиламмония (TBAF) в ТГФ через 0.5 ч привело к моноэфиру, в котором снятие TBS-группы

при атоме C(28) при $\sim 20^\circ\text{C}$ за 24 ч дало соединения **15**.

В последнее десятилетие активно ведутся исследования, направленные на поиск лекарственных агентов ингибиторов продукции оксида азота на основе нативных веществ. Весьма перспективными в этом отношении оказались лупановые тритерпеноиды и их некоторые синтетические производные.

Мы предположили, что синтетические комбинации бетулина, бетулиновой или бетулоновой кислот с молекулами-антиоксидантами, содержащими фармакофорный хромановый фрагмент α -токоферола, позволят выявить новые вещества комплексного действия с NO-модулирующей и антирадикальной активностью.

Влияние конъюгатов на функциональное состояние макрофагов оценивалось *in vitro* по их действию на продуцирование оксида азота макрофагами, активированными липополисахаридами (ЛПС), а также на активность макрофагальной аргиназы. Среди новых синтезированных гибридных молекул обнаружены соединения **10а,б**, проявившие противовоспалительные и иммуномодулирующие свойства. Полученные конъюгаты не проявили цитотоксичности в отношении перитонеальных макрофагов мышей в МТТ-тесте. В отличие от исходной бетулиновой кислоты они селективно влияли на активированные липополисахаридами макрофаги, подавляя продуцирование оксида азота и не изменяя активность аргиназы. Учитывая низкую токсичность и селективность в отношении макрофагов, полученные соединения могут быть взяты за основу при создании лекарственных средств эффективных при различных аутоиммунных заболеваниях (ревматоидный артрит, сахарный диабет I типа).

Экспериментальная часть

ИК-спектры записывали на спектрометре «Specord IR-75» в тонком слое или в растворе CHCl_3 . УФ-спектры получали на спектрометре «Specord M-40». Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C регистрировали на приборе «Bruker AVANCE-400» (^1H - 400.13 МГц; ^{13}C - 100.62 МГц) в CDCl_3 , внутренний стандарт - Me_4Si . Масс-спектры записывали на спектрометре «Bruker-Autoflex III» в режиме MALDI TOF с регистрацией положительных ионов и использованием в качестве матриц 2,5-дигидроксibenзойной и α -циано-4-гидроксициннамовой кислот. Оптическое вращение определяли на поляриметре «Perkin-Elmer-141», удельное вращение выражали в $(\text{град}\cdot\text{мл})\cdot(\text{г}\cdot\text{дм})^{-1}$, концентрацию раствора - в $\text{г}\cdot(100\text{ мл})^{-1}$. Элементный анализ выполняли на анализаторе «Karlo Erba 1106». Для ТСХ использовали пластинки Sorbfil («Сорбполимер», Краснодар, Россия). Для колоночной хроматографии применяли силикагель L(50-160 мкм) марки КСКГ. В работе использовали рацемический α -токоферол (смесь восьми диастереомеров), DCC, EDC, CDI, DMAP, HOBT, Cbz-Gly, Cbz-L-Val, Cbz-L-Phe, Cbz-Gly, N_α, N_ϵ -

(Cbz) $_2$ -L-Lys, TBAF, TBS-Cl, имидазол, «Trolox», 10% Pd/C на активированном угле, оксалилхлорид фирмы «Fluka». Бетулин выделяли известным способом ^[10], бетулоновую, бетулиновую, 3-*O*-ацетилбетулиновую кислоты и их хлорангидриды получали по описанным ранее методикам ^[11-13]. Гидразид **5а** синтезировали по методу ^[14]. Хроманилметанол **6** получали трехстадийной трансформацией из кислоты «Trolox» ^[15], TBS-эфиры **12** (см. лит. ^[6]) и **13** (см. лит. ^[17]).

(RS)- α -Токоферил- α -аминокарбоксилаты 1а-г (общая методика). К раствору 1 ммоль соответствующего соединения в 15 мл этанола добавляли катализатор - 10% Pd/C (20% от массы исходного соединения) - и перемешивали 2-4 ч при комнатной температуре в атмосфере водорода. По окончании реакции (ТСХ-контроль в системе CHCl_3) катализатор отфильтровывали, промывали этанолом, фильтрат упаривали. Полученные соединения **1а-г** оказались неустойчивыми при хранении, поэтому их использовали в последующих реакциях без предварительной хроматографической очистки.

(RS)- α -Токоферил- α -{N-[3-оксолуп-20(29)-ен-28-онил]-амино}карбоксилаты 3а-д (общая методика). А. Раствор 1 ммоль соответствующего хлорангидрида **2а-в** и 1.1 ммоль амина **1а-г** в 10-12 мл сухого бензола кипятили 0.5-1 ч (ТСХ-контроль в системе хлороформ-метанол 10:1). Охлаждали до комнатной температуры, промывали 10%-ным раствором NaHCO_3 , водой, сушили над MgSO_4 и упаривали в вакууме. Остаток хроматографировали на колонке с SiO_2 (элюент - CHCl_3) и получали соответствующий конъюгат **3а-д**.

[2,5,7,8-Тетраметил-2-(4,8,12-триметилтридецил)-3,4-дигидро-2H-хромен-6-ил]-2S-{N-[3-оксолуп-20(29)-ен-28-онил]амино}-3-метилбутаноат (3б). Выход 72%, $[\alpha]_D^{20} -4.1^\circ$ (с 1.6, CHCl_3). Найдено (%): C, 79.49; H, 10.78; N, 1.43. $\text{C}_{64}\text{H}_{103}\text{NO}_5$. Вычислено (%): C, 79.53; H, 10.74; N, 1.45. ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 1640 (CONH); 1700 (C=O); 1730 (O=C=O); 3390 (NH). УФ-спектр (CHCl_3), $\lambda_{\text{max}}/\text{нм}$ (ϵ): 287 (1785). Спектр ЯМР ^1H (δ , м.д., J/Гц): 0.87 (м, 12H, Me-C(4''), Me-C(8''), Me-C(12'')); 0.90, 0.92, 0.93, 1.00, 1.08 (все с, по 3H, Me-C(4''), Me-C(8''), Me-C(10''), Me-C(14'')); 1.14 (д, 6H, Me-Prⁱ, J = 5.6); 1.20-1.92 (м, 21H, CH₂, CH в остатке бетулоновой кислоты, 1H, Prⁱ, 26H, Me-C(2), CH₂, CH в остатке α -токоферола); 1.69 (с, 3H, Me-C(20'')); 1.97, 2.01, 2.09 (все с, по 3H, Me-Ar); 2.35-2.55 (м, 3H, HC(13'), H₂C(16'')); 2.70 (т, 2H, H₂C(4), J = 6.2); 3.14 (м, 1H, HC(19'')); 4.60, 4.75 (оба с, по 1H, H₂C(29'')); 4.59 (д.д, 1H, CHNH), J = 9.2, J = 3.6); 6.10 (д, 1H, NH, J = 9.2).

Ацилирование 6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметил-3,4-дигидро-2H-хромен-2-карбогидразида (5а) хлорангидридами бетулоновой, бетулиновой и О-ацетилбетулиновой кислот. К раствору 1.1 ммоль соединения **5а** и 2 ммоль EDC в 15 мл абсолютного CH_2Cl_2 при перемешивании прибавили 1 ммоль свежеприготовленного хлорангидрида **2а-в** соответствующей лупановой кислоты. Реакционную массу кипятили 12 ч (ТСХ-контроль в системе хлороформ-метанол 10:1), после охлаждения разбавили 25 мл CH_2Cl_2 , промыли водой (50 мл),

сушили MgSO_4 и упарили. Остаток хроматографировали на колонке с SiO_2 (элюент – CHCl_3), получили соединения **10а-в** соответственно.

6-Гидрокси-N'-[3-оксолуп-20(29)-ен-28-онил]-2,5,7,8-тетраметил-3,4-дигидро-2H-хромен-2-карбогидразид (10а). Выход 65%, аморфный порошок, $[\alpha]_D^{20} + 12.7^\circ$ (CHCl_3). Найдено (%): С, 75.47; Н, 9.18; N, 4.07. $\text{C}_{44}\text{H}_{64}\text{N}_2\text{O}_5$. Вычислено (%): С, 75.39; Н, 9.20; N, 4.00. ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 3390 (CONH); 1700 (C=O); 1740 (CONH). УФ-спектр (CHCl_3), $\lambda_{\text{макс}}/\text{нм}$ (ϵ): 293 (2920).

Ацилирование бетулиновой кислоты гемисукцинатами хроманолов 7 и 9. К раствору 1 ммоль бетулиновой кислоты в 35мл безводного ТГФ при перемешивании последовательно прибавили 0.2 ммоль DMAP, 2.2 ммоль соединения **7** или **9**, 2.4 ммоль DCC. Реакционную массу перемешивали ~24ч (ТСХ-контроль хлороформ-метанол 20:1), осадок отфильтровали, фильтрат упарили, остаток хроматографировали на колонке с SiO_2 (элюент – CHCl_3), получили соединения **11а,б** соответственно.

Гидрогенолиз соединений 11а,б

К раствору 0.1 ммоль соединений **11а** или **11б** в 7 мл безводного Et_2O добавили 20% Pd/C и перемешивали в атмосфере водорода 6 ч. По окончании реакции (ТСХ-контроль в системе гексан:этилацетат 3:1) катализатор отфильтровали, промыли Et_2O , фильтрат упарили, остаток хроматографировали на колонке с SiO_2 (элюент – CHCl_3), получили соединения **11в** или **11г** соответственно.

3β-O-[4-[(6-Гидрокси-2,5,7,8-тетраметил-3,4-дигидро-2H-хромен-2-ил)метокси]-4-оксобутаноил]бетулиновая кислота (11в). Выход 56%, аморфный порошок, $[\alpha]_D^{20} + 1.20^\circ$ ($\text{C } 3.92$, CHCl_3). Найдено (%): С, 74.67; Н, 9.02. $\text{C}_{48}\text{H}_{70}\text{O}_8$. Вычислено (%): С, 74.38; Н, 9.10. ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 1730 (O–C=O). УФ спектр (CHCl_3), $\lambda_{\text{макс}}/\text{нм}$ (ϵ): 295 (2941). Спектр ЯМР ^1H (δ , м.д., J/Гц): 0.90, 0.94, 0.98, 1.00, 1.08 (все с, по 3H, H(23'), H(24'), H(25'), H(26'), H(27')); 1.18–2.30 (м, 29H, CH_2 , CH в остатке бетулиновой кислоты, Me-C(2), H(3) в остатке хроманола); 1.69 (с, 3H, H(30')); 2.09, 2.11, 2.16 (все с, по 3H, Me-Ar); 2.65–2.80 (м, 6H, H(4), CH_2 в мостике); 3.02 (м, 1H, H(19')); 4.12–4.19 (м, 2H, CH_2O); 4.50 (д.д., 1H, H(3'), J = 5.0, J = 9.2); 4.62, 4.75 (оба с, по 1H, H(29')).

Синтез ацилатов (общая методика). К 0.24 ммоль соединения **12** в 5 мл сухого CH_2Cl_2 добавили при перемешивании 0.03 ммоль DMAP, 0.27 ммоль соответствующего соединения **13** и 0.27 ммоль DCC. Реакционную смесь перемешивали 20ч при ~20 °С. Выпавший осадок отфильтровали, фильтрат упарили в вакууме. Остаток хроматографировали на колонке с SiO_2 (элюент – CHCl_3). Получили соединение **14**.

3β-[(6-Гидрокси-3,4-дигидро-2,5,7,8-тетраметил-2H-1-бензопиран)-2-карбокси]луп-20(29)-ен-28-ол (15б). К раствору 0.06 г (0.08 ммоль) соединения **15а** в 3мл сухого ТГФ при охлаждении (0 °С) и в атмосфере аргона добавили по каплям раствор 0.04 г (0.15 ммоль) TBAF в 0.15мл ТГФ. Реакционную смесь перемешивали 24ч при ~20 °С (ТСХ-контроль

в системе хлороформ), затем разбавили водой, экстрагировали AcOEt , промыли NaCl , сушили над MgSO_4 . Остаток хроматографировали на колонке с SiO_2 (элюент – CHCl_3). Выход 57%, аморфный порошок, $[\alpha]_D^{20} + 17.4^\circ$ ($\text{C } 0.69$, CHCl_3). Найдено (%): С, 78.21; Н, 9.89. $\text{C}_{44}\text{H}_{66}\text{O}_5$. Вычислено (%): С, 78.29; Н, 9.86. ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 1726 (O–C=O). УФ-спектр (CHCl_3), $\lambda_{\text{макс}}/\text{нм}$ (ϵ): 295 (2153).

Библиографический список

- 1 Бурлакова Е.Б., Храпова Н.Г. // *Успехи химии* **1985**. Т. 54. С. 1540.
- 2 Химическая и биологическая кинетика. Новые горизонты. Биологическая кинетика: Сб. обзорных статей. М.: Химия. **2005**. С. 2.
- 3 Nordberg J., Arner E.S.J. // *Free Radical Biology and Medicine*. **2001**. Т. 31. С. 1287.
- 4 Одионов В.Н., Спивак А.Ю., Кнышенко О.В. // *Биоорганическая химия* **2007**. Т. 33. С. 387.
- 5 Detsi A., Bouloubasi D., Prousis K.C., Koufaki M., Athanasellis G., Melagraki G., Afantitis A., Igglessi-Markopoulou O., Kontogiorgis Ch., Hadjipavlou-Litina D.J. // *Journal of Medicinal Chemistry*. **2007**. V. 50. P. 2450.
- 6 Di Stefano A., Sozio P., Cocco A., Iannitelli A., Santucci E., Costa M., Pecci L., Nasuti C., Cantalamessa F., Pinnen F. // *Journal of Medicinal Chemistry*. **2006**. V. 49. P. 1486.
- 7 Mukherjee R., Kumar V., Srivastava S.K., Agarwal S.K., Burman A.C. // *Anti-Cancer agents in Medicinal Chemistry*. **2006**. V. 6. P. 271.
- 8 Толстиков Г.А., Флехтер О.Б., Шульц Э.Э., Балтина Л.А., Толстиков А.Г. Бетулин и его производные. Химия и биологическая активность. // *Химия в интересах устойчивого развития*. **2005**. Т. 30. С. 1-30.
- 9 Толстиков Т.Г., Сорокина И.В., Толстиков Г.А., Толстиков А.Г., Флехтер О.Б. Терпеноиды ряда лупана – биологическая активность и фармакологические перспективы I. Природные производные лупана. // *Биоорганическая химия*. **2006**. Т. 32. С. 42-55.
- 10 Толстиков Г. А., Горяев М. И., Ким Х. О., Хегай Р. А. // *Журн. прикл. химии*. **1967**. V. 40. С. 920.
- 11 Флехтер О. Б., Бореко Е. И., Нигматуллина Л. Р., Третьякова Е. В., Павлова Н. И., Балтина Л. А., Николаева С. Н., Савинова О. В., Еремин В. Ф., Галин Ф. З., Толстиков Г. А. // *Биоорганическая химия*. **2004**. Т. 30. С. 89.
- 12 Кондратенко Р. М., Балтина Л. А., Васильева Е. В., Балтина Л. А., мл., Исмагилова А. Ф., Насыров Х. М., Басченко Н. Ж., Киреева Р. М., Фридман С. М., Толстиков Г. А. // *Биоорганическая химия*. **2004**. Т. 30. С. 61.
- 13 Hiroya K., Takahashi T., Miura N., Naganuma A., Sakamoto T. // *Bioorganic Medicinal & Chemistry*. **2002**. V. 10. P. 3229.
- 14 Lopez G.V., Blanco F., Hernandez P., Ferreira A., Piro O.E., Batthyany C., Gonzalez M., Rubbo H., Cerecetto H. *Bioorg. // Med. Chem.* 2007, 15, 6262.
- 15 Pope S.A.S., Burtin G.E., Clayton P.T., Madge D.J., Muller D.P.R. // *Free Radical Biology and Medicine*. **2002**. V. 33. P. 807.
- 16 Lei H., Atkinson J. // *Journal of Organic Chemistry*. **2000**. V. 65. С. 2560.
- 17 Hiroya K., Takahashi T., Miura N., Naganuma A., Sakamoto T. // *Bioorganic Medicinal Chemistry*. **2002**. V. 10. P. 3229.